云 南 植 物 研 究　1996; **18** (4): 454～458
Acta Botanica Yunnanica

海芋胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及性质研究

王 东　季本仁　曾 英　余 兵

（中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204）

摘要　利用亲和层析和分子筛凝胶过滤等技术，从海芋（*Alocasia macrorrhiza*）根茎中分离纯化到一种胰蛋白酶抑制剂，简称 AMTI。经 PAGE、SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定均显示单一条带，经 SDS-PAGE 测定，其分子量为 22 000，经等电聚焦（IEF）测定，其等电点为 6.2。根据对胰蛋白酶的抑制比可知该抑制剂为单头抑制剂，其抑制活性在 60℃和 pH5～11 范围内保持稳定。

关键词　海芋，胰蛋白酶抑制剂，分离与纯化

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A TRYPSIN INHIBITOR FROM ALOCASIA MACRORRHIZA

WANG Dong, JI Ben-Ren, ZENG Ying, YU Bing

(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204)

Abstract　A trypsin inhibitor named AMTI has been isolated and purified from the rhizome of *Alocasia macrorrhiza* by a procedure including affinity chromatography on trypsin- Sepharose 4B and gel filtration with Sephadex G-100. This inhibitor was homogeneous on PAGE, SDS-PAGE, IEF and Western blot. It appeared as a single band of about 22 000 dalton on SDS-PAGE. The isoelectric focusing(IEF) showed that its PI was about 6.2. Its inhibitory activity to trypsin indicated that AMTI was a single-headed inhibitor. This inhibitor was stable against heat and pH.

Key words　*Alocasia macrorrhiza,* Trypsin inhibitor, Isolation and purification

蛋白酶抑制剂广泛存在于植物体内，目前发现的植物蛋白酶抑制剂已逾百种，它们主要分布在豆科、茄科、禾本科、葫芦科、泽泻科和桑科等植物中，在天南星科中也有报道，吴克佐等（1981）从半夏中分离到一种胰蛋白酶抑制剂，并对它的特性进行了报道。

蛋白酶抑制剂分子量一般都比较小，作用机制清楚，是研究蛋白质相互作用的合适材料。在蛋白质的一级结构、溶液构象、晶体结构、作用机制、功能区域拆分、构象重组、基因结构与表达等方面的研究工作中是一较为理想的研究对象。作为基因表达的初级产物，蛋白酶抑制剂已成为抗虫基因工程较理想的元件（周兆兰等，1994）。生物体内许多重要的生理过程都受蛋白酶及其抑制剂的调控，在临床医学的诊断、治疗和预防等方面，蛋白酶抑制剂作为新型药物显示出了广阔的应用前景，而且已在医学上得到了应用（戚正武，1988）。为适应这些需要，寻找新的更有效的蛋白酶抑制剂就显得意义重大。

天南星科植物海芋（*Alocasia macrorrhiza*），民间作为草药，能消肿解毒，内服健胃止咳。本文报道从海芋根茎中分离纯化胰蛋白酶抑制剂，并对其性质进行了一些研究。

1996-01-08 收稿, 1996-05-15 修回

材料和方法

海芋（*Alocasia macrorrhiza*）根茎采于西双版纳勐仑地区，于-20℃冷藏备用。

固相化胰蛋白酶的制备

参照谭复隆等（1981）的方法进行。取湿重 16 g 的 Sepharose 4B 加水 30 mL,于冰浴上电磁搅拌, 称取 6 g CNBr 溶于少量乙腈中, 逐滴加入 Sepharose 4B 中并不断调整 pH 在 11 左右, 待 pH 不再降低后继续反应数分钟，用 2 000 mL 冰水抽洗, 并用 500 mL 0.1 mol / L Na_2CO_3 抽洗 5 min, 再用 300 mL 0.025 mol / L, pH 10.2 的硼酸缓冲液（内含 0.02 mol / L $CaCl_2$）抽洗, 然后加入到 4 ℃预冷的 30 mL 胰蛋白酶溶液中（胰蛋白酶约 100 mg, 溶于同一缓冲液中）。4 ℃下缓慢搅拌 16 h。然后将凝胶装柱, 用 2～3 倍柱床体积的 0.2 mol / L 甲酸洗涤, 接着用上述硼酸缓冲液充分洗涤直至流出液 OD_{280} = 0.007。再用 100 mL 1 mol / L 乙醇胺封闭 2 h。接着用均含有 1 mol / L NaCl, 0.025 mol / L $CaCl_2$ 的 0.1 mol / L, pH4 醋酸缓冲液及 0.1 mol / L, pH8 硼酸缓冲液分别交替洗涤 3 次。最后用含 0.1 mol / L NaCl, 0.025 mol / L $CaCl_2$ 的 0.01 mol / L, pH4 醋酸缓冲液平衡, 并加 NaN_3 至终浓度 0.01%。于 4℃保存待用。

PAGE

采用不连续垂直板电泳。浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 7%, 以 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液（含 0.6% Tris, 2.88% Gly）为电极缓冲液。起始电流为 10 mA / 板，进入分离胶后电流为 20 mA / 板。待前沿移至距底端约 1～2 cm 时停止电泳，固定后用考马斯亮兰染色。仪器：垂直板电泳槽（Mighty small slab gel electrophorsis unit SE250, Hoefer），稳压稳流电源（Electrophoresispower supply EPS500 / 400, Pharmacia）。

SDS-PAGE

按 Sigma 公司（1982）推荐的方法进行。分离胶浓度为 11%，分子量标准为 Sigma 产品。仪器同上。

等电聚焦（IEF）

根据 Pharmacia （1984）的方法进行 。两性电解质 Pharmalyte(3～10)和标准蛋白均为 Pharmacia 出品。电流 1～2 mA / 管,限制最大电压为 500 V, 电泳时间 10 h 。仪器：圆盘电泳槽（Hofer），电源(RS2500 DC power supply,　Hofer)。

兔抗 AMTI 血清的制备

以纯化 AMTI 为抗原免疫家兔，按 Judith（1981）的方法采用多点皮下注射进行基础免疫（每只兔子注射抗原 75 μg)。70 天后进行强化免疫（每只兔子注射抗原 40 μg）, 第 90 天采血用免疫双扩散测定效价为 16, 立即颈动脉放血, 分离血清后于-20℃保存。

免疫印迹（Western blot）

二抗的酶标记　羊抗兔血清为本实验室制备。按王世中（1980）的方法纯化得电泳纯 IgG。采用过碘酸钠法（梁训生，1985）以辣根过氧化物酶（RZ = 3, 上海生化所）进行标记, 最后酶标 IgG 克分子比为 1.13。

免疫印迹　SDS-PAGE 按前法进行。转印及显色按 Tijssen（1985）和 Camphell（1984）的方法进行。硝酸纤维素膜为 0.45 μm,转移缓冲液为 0.025 mol / L Tris, 0.192 mol / L glysine, 20% 甲醇, 0.002 %SDS, pH7.3。转移时间 10 h。恒流 100 mA。10 ℃冷却。一抗（兔抗 AMTI 血清）稀释 5 倍，酶标二抗稀释 100 倍，底物为 4-氯-1-萘酚。仪器：垂直板电泳槽（SE250,Hofer）, 转印槽（Hofer）, 直流电源（EPS500 / 400, Pharmacia），循环冷却装置（Digital-Thermostate, Hofer）。

蛋白质含量测定

采用 Lorry 法。仪器：分光光度计（UV-1206,岛津）。

胰蛋白酶抑制剂活力测定

（1）以 BAEE 为底物测定抑制活力，按张龙翔（1987）的方法进行。仪器同上。

（2）以 BAPNA 为底物，按 Tscheche（1967）的方法进行。仪器同上。

结果与讨论

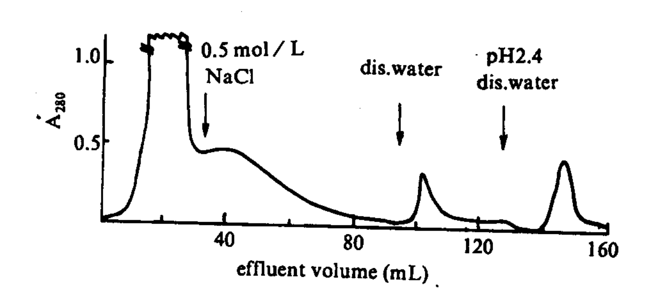


图 1 海芋粗蛋白在胰蛋白酶-Sepharose 4B 柱上的层析行为柱：1.2×14 cm; 流速：0.5 mL / min

Fig. 1 Protein elution on a trypsin-Sepharose 4B column (column: 1.2×14 cm)

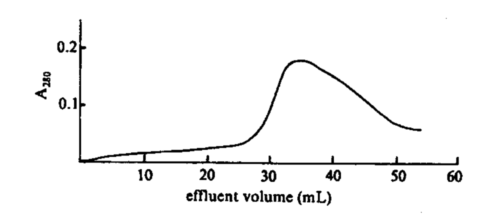


图 2 AMTI 在 Sephadex G-100 凝胶柱上的洗脱曲线柱：1 ×68 cm；流速：18 mL / hr

Fig. 2 Elution profile of AMTI on a Sephadex G-100 column (column:1×68 cm)

海芋胰蛋白酶抑制剂（AMTI）的分离纯化

取冷冻保存的海芋根茎，加 3 倍体积 0.05 mol / L 磷酸钠缓冲液（含 0.2 mol / L NaCl），高速捣碎后 4 ℃下提取过夜。滤去粗渣，8 000 r / min 离心 30 min。上清液用 75%饱和度的硫酸铵盐析，8 000r / min 离心 15 min，弃上清液，沉淀溶于少量蒸馏水并对水透析，再对 0.001 mol / L, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液透析平衡。冷冻干燥得到海芋粗蛋白，-20 ℃保存。

粗蛋白冻干粉溶于 0.1 mol / L, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液（含 0.02 mol / L $CaCl_2$）中，在胰蛋白酶-Sepharose 4B 柱上进行亲和层析。上样后先以含 0.5 mol / L NaCl 的平衡缓冲液洗涤，再用蒸馏水洗去残留的 NaCl。最后用 pH 2.4 的 HCl 酸化水洗脱，收集洗脱峰并立即中和，真空冷冻干燥（图 1）。

将亲和纯化所得冻干粉溶于 0.05mol / L, pH7.5 磷酸缓冲液并对该液透析平衡。然后用 Sephadex G-100 柱进行分子筛凝胶过滤，即得纯化的 AMTI（凝胶过滤时已无明显可检出的杂蛋白峰（图 2)。经 PAGE, SDS-PAGE, IEF 和 Western blot 检测均为一条带（图 3,4)。

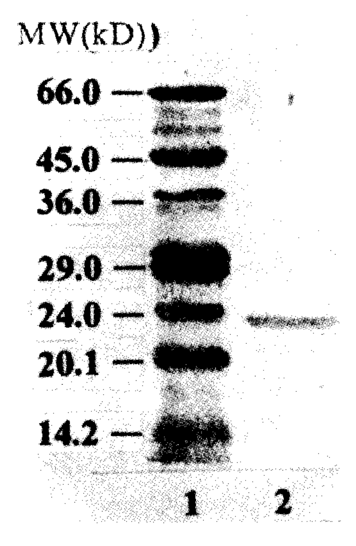
海芋胰蛋白酶抑制剂的若干性质

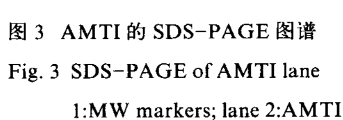
分子量 经 SDS-PAGE 测得该抑制剂分子量约为 22 000。

等电点 用等电聚焦测得该抑制剂的等电点为 6.2。

抑制活性 以 BAEE 为底物时，AMTI 抑制比活力为 9 000 BAEE 单位 / mg 蛋白，而粗提液和粗蛋白的抑制活力分别为 40 和 60 BAEE 单位 / mg 蛋白，纯化后的 AMTI 比活力分别提高了 225 和 150 倍。其对胰蛋白酶的重量抑制比为 1:0.84，克分子比为 1:0.79（胰蛋白酶分子量以 23 300 计）。

热稳定性 将 AMTI 用不同的温度和时间处理后再以 BAPNA 为底物测定抑制活力的变化，结果见表 1。




图 3 AMTI 的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 SDS-PAGE of AMTI lane 1:MW markers; lane 2:AMTI

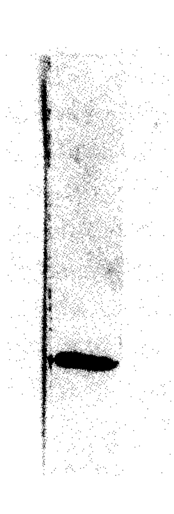


图 4 AMTI 的 Western blot 图谱
Fig. 4 Western blot of AMTI

表 1 不同温度和时间处理后的剩余抑制活力（%）

Table 1 Residual activity （%） of AMTI after heat treatment

Temperature(℃)	Time(min)		
	5	10	30
60	100	100	100
80	96	88	36
100	64	38	3

pH 稳定性　AMTI 分别在 pH3，pH5，pH7，pH9，pH11 的条件下 4℃ 放置 24 h 后，调 pH 至 8，后以 BAPNA 为底物测定抑制活力的变化。结果表明经 pH3 处理后，AMTI 抑制活力下降 30%，其余各处理对抑制活力无显著影响。

我们从海芋中获得的胰蛋白酶抑制剂 AMTI 是一个小分子蛋白质，而在蛋白抑制剂中则属于中等大小的分子。根据其对胰蛋白酶的克分子抑制比可知，AMTI 是一单头抑制剂。与已报道的另一天南星科植物半夏相比，分子量较小，抑制比活力相当。后者分子量约为 40 kD，以 BAEE 为底物时，对胰蛋白酶的重量抑制比为 1∶0.88（吴克佐等，1981）。AMTI 是一种较为稳定的蛋白质，对 pH 变化有较好的稳定性，只有在较低的 pH 条件下（pH 3），其抑制活性才受到较大的影响。同时 AMTI 对高温也有一定的耐受性，经 60 ℃ 处理 30 min 抑制活性未受影响，较高温度时，活性损失较大。我们将 AMTI 在 0.05 mol／L，pH 7.5 的磷酸缓冲液中以低浓度（0.2 mg／mL）溶液状态 4 ℃ 保存一年，其抑制活性亦无明显变化。

海芋胰蛋白酶抑制剂具有分子量较小，较稳定的特点。我们对它只做了一些有限的研究，对其抑制动力学和其它理化性质以及利用等方面的工作正在进行之中。

参 考 文 献

王世中, 1980. 免疫化学技术. 北京: 科学出版社, 54

吴克佐, 陶宗晋, 1981. 从半夏中提取的胰蛋白酶抑制剂及其特性. 生物化学与生物物理学报, **13**(3): 267

张龙翔, 1987. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 165

周兆兰, 朱 祯, 1994. 植物抗虫基因工程研究进展. 生物工程进展, **14**(4) :18

戚正武, 1988. 丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构和功能. 生物化学与生物物理进展, **15**(5) :322

梁训生, 1985. 植物病毒血清学技术. 北京: 农业出版社, 213～214

谭复隆, 罗珊珊, 戚正武, 1981. 绿豆胰蛋白酶抑制剂的研究. 生物化学与生物理学报, **13**(4): 407

Camphell A M, 1984. Monoclonal antibody, In: Burdon R H, Van Knippenberg P H, ed. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol.13. Amsterdam: Elsevier, 200

Phamacia Fine chemicals, 1984. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Uppsala, Sweden, 3, 31

Judith L V, 1981. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injection. In: Jhon J L, Helen V V, ed. Methods in Enzymology, vol.73. New York: Academic Press, 46

Sigma, 1982. Tech. bulletin, No. MWS-877l, 10

Tijissen P, 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. In: Burdon R H, Van Knippenberg P H, ed. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 15. Amsterdam: Elsevier, 437

Tschesche H, 1967. Zur charakterisierung des spezifischen trypsin-inhibitors aus schweinepankreas. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, (348): 1653